原 著

分子マーカーを用いた血小板アフェレーシスに おける止血機能動態の分析

照屋 純 梅嶋 朱美 鶴岡由美子

帝京大学市原病院輸血部, 第3内科

風間 睦美 森岡真知子 杉山 美雪

鎌倉 正英 安部 英

帝京大学輸血部, 第1内科

(昭和61年11月29日受付)

CHANGES OF HEMOSTATIC MOLECULAR MARKERS DURING DONOR PLATELETPHERESSES USING CELL SEPARATORS

Jun Teruya, Akemi Umejima, Yumiko Tsuruoka, Mutsuyoshi Kazama*, Machiko Morioka*,
Miyuki Sugiyama*, Masahide Kamakura* and Takeshi Abe*

Third Division, Department of Medicine and Blood Transfusion Service, Teikyo University
School of Medicine, Ichihara Hospital

*First Division, Department of Medicine and Blood Transfusion Service, Teikyo University School of Medicine

The changes of hemostatic molecular markers such as beta-thromboglobulin, platelet factor 4, fibrinopeptide A, soluble fibrin monomer complex, fibrinopeptide B beta 15—42, fibrin degradation product and fibrinogen are measured during donor plateletphereses using cell separators. They are most sensitive markers of platelet, coagulation system, and fibrinolysis. Plateletphereses were performed using Phenwall CS3000 in 13 cases and IBM2997 in 8 cases. Platelet and coagulation system were activated during plateletpheresis, although any side effect was not recognized. From the results we perform that processed volume of whole blood should be limited 2,000 ml, approximately half of ordinary apheresis, in cases of donors from the age of 45 to 54. In addition donors who are considered to have any risk factor for thrombosis also should be omitted for plateletpheresis.

I. はじめに

セルセパレータを用いる血小板アフェレーシスの施行前後の供血者の凝固線溶因子並びに血小板などの変化がこれまでに多数報告されているが、それらによれば血液学的な安全性は確立されたかのように見える。最近生体内の止血機能の分析法として、血小板、凝固、線維素溶解系の活動中に形成される代謝産物を測定することが行われるようになった。血中に微量に存在するこれらの物質は凝血学的分子マーカー（以下分子マーカー）と総称され、血中の血小板数や凝固線溶因子レベルより遙かに敏感にそれらの活性化、代謝状態を反

映する。われわれは種々の疾患において分子マーカーを測定し、止血機能の動態を適格に判定することを試みてきた。今回セルセパレータによる血小板アフェレーシスに際して、分子マーカーの動態を追跡しこの面からアフェレーシスの安全性を検討した。

II. 方 法

1) 血小板アフェレーシス：供血者は計21名で男18名、女3名で平均年齢は30.5歳であった。セルセパレータは13例はCS3000を用い、8例はIBM2997を用いた。ブラッドアクセスは両側の肘静脈より、outletはアーガイルのメジカッタカ

テーテルの16ゲージの側孔付き, inlet は同18ゲージを用いた。採血流量は、40~50ml/min, 抗凝固剤はACD-A液を用い、その全血との比は、CS3000では1:11~13, IBM2997では1:9~10とし、全血処理量は4,000mlを目標とし、 $4.8 \pm 1.2 \times 10^{11}$ の血小板を得た(表1)。

2) 血液検体は施行前、全血1,000ml処理時、終了直後の3点、体外循環回路のoutletで採血した。採血には、測定目的に従って以下に述べる抗凝固剤を予め入れた5mlのプラスチックシリンジを用い、血液をプラスチックシリンジに静かに吸引したあと、直ちに泡立たないように注意して約10回転倒混和を行い、 $2,000 \times G$, 30分間、4℃で冷却遠心して血漿分離をした。検体は全て検査時点まで-20℃に保存した。

3) 抗凝固剤(表2)

① フィブリノペプチドA(FPA), フィブリノペプチドB β_{15-42} (B β)測定用:最終濃度としてクエン酸ソーダ0.11M, ヘパリン1,000U/ml, アプロチニン1TIU/ml およびNaN₃ 0.1%を含む溶液。本抗凝固剤0.5mlに全血4.5mlを混和した。

表1 Procedure for Plateletpheresis

Cell Separator;	CS3000 in 13 cases IBM2997 in 8 cases
Blood Access;	Cubital Veins Using Argyl Medical Catheter 16G for the Outlet 18G for the Inlet
Processing Rate;	40~50ml/min
ACD-A Flow Ratio;	1:9~1:12
Total Blood Processed;	4,000ml
Platelet Yield;	$4.8 \pm 1.2 \times 10^{11}$ Platelets
Samples Drawn;	1. Before 2. After 1,000ml Processed 3. After 4,000ml Processed

② β -トロンボグロブリン(β TG), platelet factor 4 (PF4) 測定用:最終濃度として、EDTA 55mg/ml およびテオフィリン3mg/mlを含む溶液。本抗凝固剤0.3mlに全血4.7mlを混和した。

③ 可溶性フィブリンモノマー複合体(SFMC), fibrin degradation product (FDP) 測定用:3.8%クエン酸ソーダ1容に全血9容を混

Changes of β -TG during Plateletpheresis

Changes of PF4 during Plateletpheresis

図 1

表2 Assay methods for molecular markers

	Methods	Anticoagulants
1. β -TG	β -TG Riapack (Amersham)	EDTA, Theophylline
2. PF4	PF4 Ria Kit (Dynabot)	EDTA, Theophylline
3. FPA	Asserachrom FPA (Behringer-Mannheim)	Citrate Na, Heparin, Aprotinin
4. SFMC	FM Test (Behringer-Mannheim)	Citrate Na
5. B β	B β Ria Kit (IMCO)	Citrate Na, Heparin, Aprotinin
6. FDP	FDP-L (Teikoku-zoki)	Citrate Na

和した。

④ 測定法：表2のように各キットを用いて測定した。

III. 結 果

1. β TG は開始前 $40.1 \pm 20.4 \text{ ng/ml}$ から全血1,000ml 処理時点で $45.2 \pm 20.0 \text{ ng/ml}$ に増加し、血小板採取終了時には $84.7 \pm 77.4 \text{ ng/ml}$ に有意に増加した。同様に PF4 は開始前 $10.3 \pm 7.8 \text{ ng/ml}$ から1,000ml 処理時に $14.1 \pm 9.4 \text{ ng/ml}$ 、終了時には $32.5 \pm 26.8 \text{ ng/ml}$ へと有意に増加した(図1)。

2. FPA は開始前 $3.4 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$ から、全血1,000ml 処理時点で $6.4 \pm 7.8 \text{ ng/ml}$ 、終了時には $12.3 \pm 13.9 \text{ ng/ml}$ へと有意に増加した。SFMC は

施行中(－)であった。一方、フィブリノゲンは、開始前 $152.8 \pm 34.0 \text{ mg/dl}$ 、全血1,000ml 処理時点で $142.9 \pm 31.6 \text{ mg/dl}$ 、終了時には $137.1 \pm 26.0 \text{ mg/dl}$ へと有意に低下した(図2)。

3. $B\beta$ は開始前 $15.0 \pm 13.9 \text{ ng/ml}$ 、全血1,000ml 処理時点で $13.1 \pm 11.4 \text{ ng/ml}$ 、終了時には $15.6 \pm 19.2 \text{ ng/ml}$ と施行中有意な変動を示さなかった。同様に FDP も施行中常に $10 \mu\text{g/ml}$ 以下であった(図3)。

4. 各分子マーカーの機種によって分けた値を表3に示した。施行前、施行後の各分子マーカーは CS3000 と IBM2997 との間に有意差がなかった。

4. 採取した濃厚血小板中の β TG と PF4 は

Changes of FPA during Plateletpheresis

Changes of Fibrinogen during Plateletpheresis

図 2

図3 Changes of $B\beta$ -RPs during Plateletpheresis

図4 Differences of β -TG & PF4 between Normal plasma and Collected PRP

表3 CS3000とIBM2997を用いたセルセパレータ施行中の分子マーカーの変動

分子マーカー	全血処理量(ml)	CS3000	IBM2997
β TG (ng/ml)	0	41.3±18.9	41.9±23.5
	1,000	50.4±22.9	39.6±14.6
	4,000	100.9±106.9	64.2±31.1
PF4 (ng/ml)	0	11.2±8.1	10.0±7.7
	1,000	17.3±11.3	12.5±8.0
	4,000	35.4±40.3	30.1±24.0
FPA (ng/ml)	0	3.8±2.3	2.9±3.1
	1,000	9.3±9.0	2.3±2.7
	4,000	15.7±18.0	8.4±6.8
フィブリノゲン (mg/dl)	0	144.9±36.7	153.6±39.4
	1,000	140.4±29.0	147.0±34.3
	4,000	126.4±26.0	145.8±24.8
$B\beta$ (ng/ml)	0	11.1±12.8	19.9±14.4
	1,000	10.2±6.6	16.7±15.3
	4,000	6.8±4.4	25.6±25.7

* : p<0.05, ** : p<0.01, ns : not significant

図5 Changes of Molecular Markers Before & After Plateletpheresis of a Donor with Difficulty in Blood Access

各々227.4±91.4ng/ml, 104.5±32.0ng/ml であった(図4).

一方、日赤濃厚血小板中(n=20)の β TGとPF4は各々5,284.6±2,161.0ng/ml, 2,173.9±1,863.1ng/mlと高値を示した.

5. 図5は22歳男性供血者の例で、血管が細いために常に上腕にマンシェットを巻いて、40~60 mmHgで駆血をすることにより、およそ30ml/minで血流を確保していた。しかし全血3,000ml処理後急に気分不快を訴えたために、その時点で

血小板採取を終了した。 β TGは、施行前47.9ng/mlから中止時には334.5ng/ml、PF4も13.0ng/mlから125ng/mlへと増加した。FPAは施行前2.0ng/mlから64.0ng/mlへと増加し、SFMCも(－)から(2+)となった。一方、B β は12.2ng/mlから16.0ng/ml、FDPは10 μ g/mlから10 μ g/ml以下へといずれも正常範囲内での変動を示したに過ぎなかった。

IV. 考 案

生体中の止血機能の動態は、従来活性化、消耗に基づく血小板数や凝固、線維素溶解因子の減少を指標として推定されるに過ぎなかった。近年、これらの活動によって形成される微量の代謝産物の増加が、血小板や凝固、線維素溶解系の活性化を鋭敏に反映するものとして、従来凝血学的には困難であった凝固亢進状態の検出、臨床的には血栓症やDICの診断に応用されるようになった。これらの代謝産物は分子マーカーと総称される^{1)~3)}。血中の血小板や凝固系、線維素溶解系の活性化は、分子マーカーによって従来よりも鋭敏に検出されると考えられる。

セルセパレータを用いた血小板アフエーシスは最近多くの病院、血液センターなどで行われている。この血小板採取は供血者の安全性のために厚生省による採血基準は通常の200ml、400ml採血や血漿採取よりも厳しくなっている。即ち、年齢が18~54歳、体重50kg以上、血液比重1.052以上あるいは血色素量12.5g/dl以上、血清総蛋白量6.1g/dl以上、血小板数15万/ μ l以上であり、年間実施回数は12回以内に限定されている⁴⁾。

この血小板アフエーシス施行中の主たる副作用はvasovagal reflex(VVR)、あるいは多量のクエン酸ナトリウムの流入による低カルシウム血症などに基づくものと考えられているが、施行中にVVRでは説明し得ない種々の心電図変化をみたという報告もあり⁵⁾、供血者の安全性は必ずしも完全に保証されている訳では無い。また、頻回の血漿アフエーシスでは、低蛋白血症、低アルブミン血症、脂質代謝異常、アンチトロンビンIIIの減少、血小板機能亢進などを伴うことから動脈硬化症や心筋梗塞あるいは血栓症を合併する危険性

が想定され、それらは通常の臨床検査では見逃される可能性のあることが指摘されている^{6)~8)}。

一方、施行中の血液凝固因子、血小板数などの変化に関する研究は多くなされており、殊に血小板数とフィブリノゲンの低下などが報告されているが、何れも一過性のもので特に供血者に対して重大な影響を及ぼすものでは無いとされてきた⁹⁾。

然るに、アフエーシス中供血者の血中 β TG、PF4は全血処理量の増加に応じて直線的に増加し、終了時、即ち全血4,000ml処理時には平均値と共に標準偏差が増加した。フィブリノゲンは施行中に有意に低下し、同時にFPAの増加が見られたため、それはモジュールへのフィブリノゲン吸着だけではなく、凝固系が活性化されたことも関与すると考えられた。この結果から血小板、凝固系の活性化が血小板アフエーシスの際におこるが標準偏差が大きく、セルセパレータによる血小板、凝固系の活性化は個人差が大きいということを示している。

セルセパレータの機種に因る差は表3に示したが、統計学的に有意差が無いものでも施行後には増加する傾向にあり、2つの機種に因る差は無いものと考えられた。

即ち、先に述べたような止血機能の指標として極めて鋭敏な分子マーカーを用いて検討すると、血小板アフエーシス施行後には血小板、凝固系が活性化され血栓症発症の2つの大きなリスクファクターが増大したと判定された。それは血栓症をおこしやすい疾患の1つであるSLE患者の分子マーカーの値のプロフィルに近いものである。であるから一見正常と思われる集団の中から、既に血栓症のリスクファクターをもっている供血者を極力除外する必要がある。即ち、セルセパレータによるアフエーシスに当たっては施行前から β TG、PF4、FPAが高値である供血者の場合、さらに血小板活性化、凝固亢進が進んで血栓症を発症する危険性のあることは否定できない。

このように供血者の血小板、凝固系の活性化がおこっているが、採取した濃厚血小板中の β TG、PF4は中等度増加しているに過ぎず、日赤より供

給される濃厚血小板中のそれらの1/10以下であった。であるから、少なくともセルセパレータにて採取した濃厚血小板中の活性化血小板や凝固因子が、受血者に与える影響は日赤濃厚血小板よりも少ないと考えられた。日赤濃厚血小板中で β TG, PF4がより高値であるのは、血小板作成時の遠心操作、濃厚血小板の室温保存に於ける血小板の活性化あるいは崩壊などが関与していると考えられる。

図5に示したケースは血小板より β TGを精製する目的でCS3000にて血小板アフエーシスを施行したボランティアである。施行前のスクリーニングとしては通常の血算、プロトロンビン時間、GOT, GPT, TTT, ZTT, 心電図、血清梅毒反応、HBs抗原の検査を行い、それらは全て正常であった。血小板アフエーシスを開始したが、血管が細いため当初より採血流量不良のアラームが屢々鳴り、その度に駆血や採血側の腕を暖めたりすることにより、25~35ml/minの血流量で採取を続けていた。しかし全血3,000ml処理時点で急に気分不快を訴えたため血小板採取を中止した。その時の分子マーカーは β TG, PF4, FPAが異常高値を示し、凝固亢進に対して比較的感度の低いSFMCでさえも2+であったことは極めて強い血小板、凝固系の活性化がおこっていたことを示唆するものである。この活性化は、採血困難により回路内の血流が中断したり、屢々流量を変えざるを得なかったことに関係していると思われる。

先に述べたように血小板採取は年齢制限などを含めて最も厳しい基準があり、また各施設独自にスクリーニング項目を定めて、“健康な”供血者の選択に努めている¹⁰⁾。善意の正常供血者に対する血小板アフエーシスの施行中、あるいは施行後でもそれに関係がある可能性のある事故は100%防止しなくてはならない。

血栓症は血小板あるいは凝固系の活性化に血流や血管の要因が複雑に関係して発症すると考えられており、 β TG, FPAの臨界値を定めることは不可能である。しかしながら、脳閉塞性血管障害の患者では β TGが100ng/ml以上、あるいはFPAが20ng/ml以上に及ぶものがあり、供血者として

はそれらの分子マーカーの前値が正常である者を供血者として選択する必要があると思われる。

しかし、供血者が血栓症のリスクファクターを有するかどうかを、この様な分子マーカーの測定によりスクリーニングすることは、時間的並びに経済的な要因からみて不可能である。それ故に、われわれは以下の点に注意してセルセパレータの安全性を図っている。

① スクリーニングにおいて心電図は必須のものであるが、その心電図上少しでも虚血性変化が疑われたり、狭心症の可能性のある胸痛などの既往をもつ供血者は除外している。また、セルセパレータ施行中は心電図モニターをしている。

② 脳閉塞性血管障害、心筋梗塞などの血栓性疾患のリスクが増える年齢を考慮して、対象年齢である18~54歳のうち45~54歳の供血者の全血処理量を通常の約半分の2,000ml以下に制限して実施している。これは、血小板、凝固系が全血処理量に比例して、すなわち時間と共に活性化が進んでいくので、処理量を少なくすることにより活性化の程度を低く抑えるのがその理由である。

③ 血流確保が困難な例の場合は、殊に供血者の状態に十分注意を払い、目標処理量まで到達しなくても長時間施行せずに中止することになっている。

V. 結 語

セルセパレータIBM2997, CS3000を用いた血小板アフエーシスに際しての凝固学的分子マーカーの変動を検討した。

① 血小板アフエーシス後には供血者の β TG, PF4, FPAが増加、フィブリノゲンが低下し、これは血小板、凝固系の活性化を意味するものと考えられた。その活性化の程度は2つの機種間に差は無かった。

② 血小板アフエーシスではB β は変化せず、線溶能の変化は認められなかった。

③ セルセパレータにて採取した濃厚血小板中の β TG, PF4は中等度増加していたが、日赤より供給される濃厚血小板中のそれらよりも遙かに少なく、受血者に対する影響は少ないと考えられた。

稿を終えるにあたり、帝京大学病院中央検査部の島津千

里氏, 並びに同輸血部の皆さんに深謝致します。

この論文の要旨は, 第34回日本輸血学会, 第1回 International Congress of the World Apheresis Association で発表した。

文 献

- 1) Wehrmacher, W.H.: Molecular markers of hemostasis: Introduction and overview. *Seminars Thrombos Hemostas*, 10(4): 215-218, 1984.
- 2) Bick, R.L., Fared, J., Squillaci, G., Walenga, J., Bermes, E.W. and Messmore, H.L.: Molecular markers of hemostatic processes. (Abst) *Fed. Proc.*, 42: 1031, 1983.
- 3) 風間睦美, 照屋 純, 中村一路, 森岡真知子, 安部 英, 島津千里: Molecular marker による止血機能のプロファイル診断. 厚生省特定疾患 血液凝固異常症調査研究班昭和60年度研究報告書, pp. 189-196.
- 4) 今井 勇: 厚生省令. 官報第17672号, 昭和61年1月10日.
- 5) Komatsu, F. and Murohashi, I.: Bradycardia

of donors during pheresis. (Abst) *Frist International congress of the World Apheresis Association*. p. 75, 1986.

- 6) Lundsgaard-Hansen, P.: Intensive plasma-pheresis as a risk factor for arteriosclerotic cardiovascular disease? *Vox Sang.*, 33: 1-4, 1977.
- 7) Lundsgaard-Hansen, P.: Donor safety in plasmapheresis. *Develop. Biol. Standard*, 48: 287-295, 1981.
- 8) 清水 勝: 供血者の選択と保護. 成分輸血療法の実際, 二之宮景光編, 南山堂, pp. 69-112, 1980.
- 9) Keller, A.J., Chirnside, A. and Urbaniak, S.J.: Coagulation abnormalities produced by plasma exchange on the cell separator with special reference to fibrinogen and platelet levels. *Br. J. Haematol.*, 42: 593, 1979.
- 10) 清水 勝: わが国における Cytapheresis の現状と供血者の安全対策について. *臨床血液*, 19(10): 1461-1466, 1978.